

(10) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(11) **DE 31 15 568 A 1**

(51) Int. Cl. 3:
B 01 F 3/08
B 01 F 5/06
B 01 L 3/02
B 01 J 4/02

(21) Aktenzeichen: P 31 15 568.5-23
(22) Anmeldetag: 16. 4. 81
(43) Offenlegungstag: 15. 4. 82

(30) Unionspriorität: (32) (33) (31)
18.04.80 US 141728

(72) Erfinder:
Klein, Gerald L., Orange, Calif., US; Camp jun., Millard M.,
Whittier, Calif., US; Meyer, Richard C., La Habra, Calif., US

(71) Anmelder:
Beckman Instruments Inc., 92634 Fullerton, Calif., US

(74) Vertreter:
Wallach, C., Dipl.-Ing.; Koch, G., Dipl.-Ing.; Haibach, T.,
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Feldkamp, R., Dipl.-Ing., Pat.-Anw.,
8000 München

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) **Verfahren und Vorrichtung zum Mischen von Flüssigkeiten unter Verwendung einer automatisierten Pipette**

Gegenstand der Erfindung ist eine automatisierte Pipette mit einer Misch-T- bzw. -Zweigleitung. Die Misch-T-Zweigleitung ist an einen Vorratsbehälter einer Verdünnungsmitteflüssigkeit anschließbar; die Verdünnungsflüssigkeit kann mit einer Probenflüssigkeit vereinigt u. d durch abwechselndes Aufziehen und Ausstoßen der Flüssigkeiten in die Pipette bzw. aus der Pipette gründlich mit dieser gemischt werden.
(31 15 568)

- 12 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Mischen von Flüssigkeiten, insbesondere zum Mischen einer Probenflüssigkeit und einer Verdünnungsflüssigkeit, unter Verwendung einer automatisierten Pipette, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:
 - (a) die Probe wird in ein Mundstück bzw. eine Spitze der automatisierten Pipette eingeführt (Fig. 2b),
 - (b) das Verdünnungsmittel wird in das Mundstück bzw. die Spitze injiziert (Fig. 2c),
 - (c) das Verdünnungsmittel und die Probe werden in einen Behälter mit solcher Geschwindigkeit ausgestoßen, daß eine Vermischung der Probe und der Verdünnungsflüssigkeit erfolgt (Fig. 2d),
 - (d) die Probe und die Verdünnungsflüssigkeit werden aus dem Behälter in die Pipette aufgezogen (Fig. 2e),
 - (e) die Probe und die Verdünnungsflüssigkeit werden in einer vorgegebenen Anzahl von Zyklen abwechselnd in der genannten Weise ausgestoßen und wieder aufgezogen, um ein gleichförmiges, homogenes Gemisch aus der Probe und der Verdünnungsflüssigkeit zu erhalten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Mundstück bzw. die Spitze von überschüssigem Proben-/Verdünnungsmittelgemisch befreit wird.
3. Automatisierte Pipette zum Vermischen von Flüssigkeiten, insbesondere zum Verdünnen von Flüssigkeiten, mit einem einen Innenraum bekannten Volumens bildenden Hohlkörperteil (12), einem an dem Hohlkörperteil (12) befestigten Mundstück bzw. einer Spalte (21) mit einer sich axial durch dieses hindurch erstreckenden Leitung (22), welche in Strömungsverbindung mit dem Innenraum (12) steht und in Strömungsverbindung mit den zu mischenden Flüssigkeiten gebracht werden kann, sowie mit dem Hohlkörperteil zusammenwirkenden Mitteln (17) zur Verschiebung der Flüssigkeiten, gekennzeichnet durch an einem vorgegebenen Punkt des Mundstücks bzw. der Spalte (21) angeordnete Mittel (24) zum Injizieren einer Flüssigkeit, insbesondere einer Verdünnungsflüssigkeit, in die Axialleitung (22) des Mundstücks bzw. der Spalte (21).
4. Pipette nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die an dem Hohlkörperteil (12) angeordneten Mittel (13 bis 17) zur Verschiebung der Flüssigkeiten einen hydrostatischen Druck ausüben, und daß die Mittel zur Injizierung einer Flüssigkeit, insbesondere eines Verdünnungsmittels, eine mit der Axialleitung (22) des Mundstücks bzw. der Spalte (21) in Strömungsverbindung stehende

3115568

3

- 24 -

Misch-T-Zweigleitung (24) aufweisen, welche an eine Vorratsquelle (20) der Flüssigkeit, insbesondere des Verdünnungsmittels, anschließbar ist.

5. Pipette nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Verschiebung der Flüssigkeiten einen in dem Innenraum (12) des Hohlkörperteils verschieblichen Kolben (17) sowie einen mit diesem verbundenen Schrittschaltmotor (13) aufweisen.

Patentanwälte Dipl.-Ing. Curt Wallach
Dipl.-Ing. Günther Koch
4 Dipl.-Phys. Dr. Tino Haibach
Dipl.-Ing. Rainer Feldkamp

D-8000 München 2 · Kaufingerstraße 8 · Telefon (0 89) 24 02 75 · Telex 5 29 513 wakai d

Datum: 16. April 1981
Unser Zeichen: 17 186 H/Nu

Beckman Instruments, Inc., Fullerton,
Cal., USA

Verfahren und Vorrichtung zum Mischen von Flüssigkeiten unter Verwendung einer automatisierten Pipette

Die Erfindung betrifft allgemein automatisierte Pipetten. Näherhin betrifft die Erfindung eine automatisierte Pipette zum Verdünnen und Mischen einer Probenflüssigkeit.

Bei vielen Meß- und Prüfgeräten, wie beispielsweise immunonephelometrischen Instrumenten, etwa der in der US-Patentschrift 4 157 871 beschriebenen Art, sind aufeinanderfolgende Handhabungen und Behandlungen der zu untersuchenden Probensubstanz erforderlich. Diese Behandlungen und Handhabungen erfordern einen großen Aufwand an Zeit der Bedienungsperson, falls eine Anzahl von Messungen an vielen Proben vorgenommen werden sollen. Zur Erzielung guter Ergebnisse muß die Bedienungsperson für jede Probe eine Reihe von Verfahrensschritten in der richtigen

Aufeinanderfolge wiederholen. Beim manuellen Pipettieren sind unter anderem Verfahrensschritte der Identifizierung einer Anzahl von Proben sowie zahlreicher Probenverdünnungen erforderlich. Da die Probenbehandlungen gewöhnlich von Hand ausgeführt werden, kommt es infolge von Ermüdung und Langeweile der Bedienungsperson häufig zu fehlerhaften Ergebnissen. Außerdem hat die verringerte Motivation der Bedienungsperson infolge von Ermüdung und Langeweile allgemein ein Absinken der Arbeitsleistung zur Folge, was erhöhte Bedienungskosten für das Laboratorium mit sich bringt. Manuelle Verdünnungsvorgänge bringen eine beträchtliche Verlängerung der für die Durchführung der Probenuntersuchung erforderlichen Zeit mit sich und können so eine Verzögerung der Resultate zur Folge haben.

Eine besondere Schwierigkeit, wie sie bei der manuellen Probenhandhabung bei Verwendung eines Meß- und Testinstruments, wie beispielsweise eines Nephelometers, auftritt, besteht im Problem einer unvollständigen Durchmischung der Probe und des Verdünnungsmittels. Während einer Analyse müssen häufig Reihenverdünnungen vorgenommen werden. Hierzu muß jeweils von jeder aufeinanderfolgenden Verdünnung ein bestimmter Bruchteil der Probe entnommen, in den nächsten Behälter überführt und dort mit dem gewünschten Volumen des Verdünnungsmittels gemischt werden. Hierbei ist es außerordentlich wichtig, daß eine gründliche Durchmischung gewährleistet ist, bevor die Probe in den nächsten Behälter überführt wird. Konzentrationsgradienten infolge unzureichender Durchmischung der Lösungen haben die Verschleppung beträchtlicher Fehler in sämtliche aufeinanderfolgenden Verdünnungen zur Folge. Bei manueller Ausführung der Reihenverdünnungen kann die

Bedienungsperson eine angemessene ausreichende Durchmischung gewährleisten, und zwar durch Rühren, kräftiges Schütteln, und durch Verwendung von Zusatzvorrichtungen, wie beispielsweise einem Vortex-Mischer, oder unter Verwendung einer Injizierspritze oder einer Gummikugelpipette zum wiederholten Aufziehen und Ausstoßen der Lösung. Das manuelle Mischen führt jedoch, wie oben erwähnt, zur Ermüdung der Bedienungsperson und langweilt diese. Eine angemessene Durchmischung ist besonders bedeutsam in einer biologischen Lösung, da die großen Moleküle in biologischen Lösungen nicht sehr rasch diffundieren und sich nicht sehr rasch vermischen.

Für Serienverdünnungen ist häufig die Verwendung einer großen Anzahl von Behältern erforderlich. In modernen Laboratorien finden dabei in großem Umfange Einweg- bzw. Wegwerf-Proberöhrchen und -behälter für diesen Zweck Anwendung. Es ist auch allgemein üblich geworden, ein magnetisches Material mit geeignetem Überzug in einen Flüssigkeitsbehälter einzubringen und durch benachbarte Anordnung eines rotierenden Magneten ein Umrühren zu bewirken. Die Anordnung und Aufrechterhaltung der großen Anzahl von Probenröhrchen und Magnet-Rührwerken für Reihenverdünnung wird jedoch sehr lästig und aufwendig. Noch lästiger und aufwendiger wird dieses Erfordernis, falls eine chemische Analysesequenz automatisiert wird. Lose Röhrelemente, wie sie in großer Zahl für automatisierte Testuntersuchungen in großem Maßstab benötigt werden, stellen vor Haushaltsprobleme. Außerdem wird bei Verwendung einer Anzahl von Verdünnungsstationen die erforderliche magnetische Kopplung mit dem äußeren Antriebsmagneten kompliziert. Andere derzeit bekannte Anordnungen

16-000000
3115568

7

-A-

beruhen auf der Ausnutzung der Geschwindigkeit einer Flüssigkeitsinjektion für die Durchmischung. Bei derartigen Anordnungen wird zur Gewährleistung einer wirksamen Durchmischung die Form des Behältergefäßes kritisch.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchmischung von Flüssigkeiten, insbesondere zur Verdünnung von Flüssigkeiten. Gemäß bevorzugten Ausführungsformen weist die Verdünnungsapparatur ein mit dem Mundstück bzw. der Spitze einer automatisierten Pipette verbundenes T-Stück auf. Dieses T-Stück bzw.

-Zweigleitung ist mit einer Verdünnungsmittelvorratsquelle verbunden und steht in Strömungsverbindung mit einer sich axial durch das Mundstück bzw. die Spitze der Pipette erstreckenden Leitung. Durch einen an dem Hauptkörper der Pipette angeordneten Kolben mit Schrittschaltmotor wird ein hydrostatischer Druck durch das Mundstück bzw. die Spitze ausgeübt. Das Verdünnungsmittel wird dem Mundstück bzw. der Spitze durch die T-Zweigleitung zugeführt. Der von dem Kolben und Schrittschaltmotor ausgeübte hydrostatische Druck bewirkt die Vereinigung der Probensubstanz und des Verdünnungsmittels durch wiederholtes Aufziehen und Ausstoßen der Probensubstanz und des Verdünnungsmittels durch eine Düsenöffnung hoher Geschwindigkeit am Ende des Mundstücks bzw. der Spitze. Auf diese Weise wird eine gründliche Durchmischung gewährleistet.

Insgesamt wird somit durch die Erfindung ein Verfahren zur Mischung zweier Flüssigkeiten, insbesondere zur Mischung einer Probenflüssigkeit und einer Verdünnungsflüssigkeit, sowie eine automatisierte Pipette zur Durchführung dieses Verfahrens geschaffen, wobei mittels der an

eine Vorratsquelle der Verdünnungsflüssigkeit anschließbaren automatisierten Pipette die Probenflüssigkeit und die Verdünnungsflüssigkeit durch wiederholtes zyklisches Aufsaugen der beiden Flüssigkeiten in die Pipette und Ausstoßen aus dieser miteinander vermischt werden.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung beschrieben; in dieser zeigen

Fig. 1 in geschnittener Seitenansicht eine automatisierte Pipette mit einer T-Zweigleitung gemäß einer Ausführungsform der Erfindung,

Fig. 2 eine schematische Darstellung zur Veranschaulichung des aufeinanderfolgenden Ablaufs von Arbeitsschritten bei der erfindungsgemäßen, nicht körperlich in die Flüssigkeiten eingreifenden Mischmethode.

Fig. 1 zeigt eine als Ganzes mit 11 bezeichnete automatisierte Pipette. Diese automatisierte Pipette 11 schließt ein Hohlkörperteil 12 und ein an diesem befestigtes Misch-T-Stück 24 auf. Mit dem hohlen Misch-T-Stück 24 steht eine abnehmbare Spitze bzw. ein Mundstück 21 in Verbindung, das mit einer durchgehenden axialen Leitung 22 versehen ist. Die Leitung 22 erstreckt sich durch die Spitze 21, das Misch-T-Fitting 24 und den Hohlkörper teil 12. Die Verbindung der Spitze bzw. des Mundstücks 21 mit dem Misch-T-Fitting 24 ist mittels einer Spitzen-Dichtung 23 abgedichtet. Die Misch-T-Zweigleitung 24 ist mit dem Hohlkörper teil 12 in Strömungsverbindung verbunden und

kann ihrerseits an einem Verdünnungsmittel-Spender 20 angeschlossen werden. Das Misch-T-Stück 24 steht mit der Leitung 22 in Strömungsverbindung und erstreckt sich zum Umfangsrand der Pipette 11, wo es mit einer von dem Verdünnungsmittel-Spender 20 kommenden Leitung verbunden ist. Mit einem Schrittschaltmotor 13 ist eine Führungs- oder Spindelschraube 14 verbunden. Mit der Führungs- bzw. Spindelschraube 14 steht eine mit Verdrehungssicherungskeil 16 versehene Antriebsmutter 15 in Eingriff. Mit der Antriebsmutter 15 ist ein Kolben 17 verbunden. Die Führungs- bzw. Spindelschraube 14 kann teleskopartig in den Hohlkolben 17 eindringen. Eine Kolbendichtung 18 mit Haltevorrichtung 19 definieren in dem Hohlkörperteil 12 einen Innenraum mit einem abgeschlossenen Volumen.

In Fig. 2 ist die automatisierte Pipette 11 aus Fig. 1 vereinfacht dargestellt. Das Misch-T-Stück bzw. -Fitting 24 ist mit dem Hohlkörperteil 12 so verbunden, daß die Misch-Zweigleitung in Strömungsverbindung mit der Leitung 22 in der Spitze bzw. dem Mundstück 21 steht. Der Kolben 17 ist in dem Hohlkörper teil 12 angeordnet, wie in Fig. 1 mit näheren Einzelheiten veranschaulicht. Der Kolben 17 übt einen hydrostatischen Druck auf eine Probensubstanz 25 in einem Behälter 26 aus. In dem T-Stück 24 ist eine Verdünnungsmittelsubstanz 27 enthalten.

Im folgenden wird die Wirkungsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung beschrieben. Gemäß Fig. 2a wird zu Beginn der Ausführung des erfindungsgemäßen Mischverfahrens mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung zunächst die Pipettenspitze 21 in die Probensubstanz 25 herabgelassen; es sei angeommen, daß das System "vorbereitet" ist. D. h. in das

10
-A-

Misch-T-Stück 24 ist Verdünnungsmittel 27 gepumpt, während das übrige Volumen in der automatisierten Pipette 11 leer ist. Gemäß Fig. 2b kann Probensubstanz aufgenommen werden, und zwar mittels einer Saugvorrichtung oder mittels einer mit dem Misch-T-Stück 24 verbundenen Verdünnungsvorrichtung, wie beispielsweise einer mit festem Verdünnungsverhältnis arbeitenden Verdünnungsvorrichtung 20. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform saugt der Verdünnungsmittel-Spender 20 Verdünnungsmittel 27 durch das Misch-T-Stück zurück wieder auf, wodurch Probensubstanz 25 in die Leitung 22 gezogen wird. Das Aufziehen der Probe kann auch durch eine Aufwärtsbewegung des Kolbens 17 erfolgen. Die Probensubstanz 25 ist somit in die Leitung 22 aufgestiegen, während das Verdünnungsmittel sich rückwärts in Richtung auf den Verdünnungs-Spender 20 und von dem Misch-T-Stück 24 und der Leitung 22 weg verschoben hat. Falls die Probensubstanz 25 durch Verschiebung des Kolbens 17 hochgezogen worden sein sollte, würde das Verdünnungsmittel in dem Misch-T-Stück 24 stationär verbleiben. Zwischen der Probe 25 und dem Misch-T-Stück 24 ist ein kleines Luftvolumen 28 erforderlich, um eine vorzeitige Vermischung der Flüssigkeiten und eine mögliche Kontamination von in dem Misch-T-Stück 24 verbleibendem Verdünnungsmittel zu vermeiden.

Gemäß Fig. 2c wird die automatisierte Pipette 11 zu einem benachbarten leeren Behälter bewegt. Im allgemeinen wird es sich hierbei um einen aus einer Reihe von Behältern 26 in einem Probengestell handeln. Von dem Verdünnungsmittel-Spender 20 (Fig. 1) wird eine vorgegebene Menge Verdünnungsmittel 27 über das Misch-T-Stück 24 in die Leitung 22 abgegeben. Gemäß Fig. 2d beginnt der Mischzyklus

11
- 8 -

mit einer Abwärtsbewegung des Kolbens 17, wodurch das gesamte in der Leitung 22 enthaltene Verdünnungsmittel 27 zusammen mit der Probensubstanz 25 aus der Leitung 22 in den Behälter 26 ausgedrückt wird. Da der Luftraum 28 zwischen der Probenflüssigkeit und dem Verdünnungsmittel klein, bezogen auf das Gesamtvolumen, ist, wird die Wirkungsweise des Instruments hiervon nicht gestört oder das Ergebnis nachteilig beeinflußt. Gemäß Fig. 2e wird durch eine Aufwärtsbewegung des Kolbens 17 ein Volumen des Verdünnungsmittel-Proben-Gemischs in die Leitung 22 aufgezogen. Dieses Volumen muß kleiner sein als das Volumen unterhalb der Misch-T-Zweigleitung 24, um eine Kontamination von in der Misch-Zweigleitung 24 verbliebenem Verdünnungsmittel 27 zu vermeiden. Die in den Figg. 2d und 2e veranschaulichten Verfahrensschritte werden zyklisch so oft wiederholt, wie es für eine wirksame Vermischung erforderlich ist. In der Praxis hat sich gezeigt, daß drei Zyklen für eine gründliche Durchmischung ausreichen. Wichtig ist, daß die Strömungsgeschwindigkeit am Austritt der Leitung 22 groß ist. Dies kann durch schnelles Pumpen und/oder durch entsprechend kleine Abmessungen der Mündungsöffnung in der Leitung 22 am Ende des Mundstücks bzw. der Spitze 21 erreicht werden.

Da in dem Hohlkörper teil 12 ein totes Luftvolumen vorliegt, kann es sein, daß beim Ein- und Auspumpen der Flüssigkeit die jeweiligen Volumen nicht genau der differentiellen Verschiebung des Kolbens 17 entsprechen. Außerdem wird Flüssigkeit in der Leitung 22 verbleiben, da der Druckanstieg und das Totvolumen der aufwärts gerichteten Kapillarkraft das Gleichgewicht halten. Daher muß der Kolben 17 beim letzten Abwärtshub weiter abwärts

geschoben werden, um jegliches kleine Volumen von Proben-Verdünnungsmittel-Gemisch, das infolge der Kapillar- und Volumendifferenzverschiebung aus dem Mischzyklus zurückbleiben kann, auszustoßen. Gemäß Fig. 2g wird sodann das Mundstück bzw. die Spitze 21 aus dem Behälter 26 herausgezogen. Der Kolben 17 kann in seine ursprüngliche obere Ausgangsstellung rückgestellt werden oder aber auch in seiner unteren Stellung verbleiben, falls die Probenaufnahme mittels des Kolbens 17 erfolgen soll. Die Spitze bzw. das Mundstück 21 kann sodann wiederum in den Behälter 26 zur Aufnahme des Gemisches für die nächste Reihenverdünnung eingeführt werden, oder aber die automatisierte Pipette 11 kann zu einem anderen Behälter gebracht werden, falls die Verdünnung abgeschlossen ist.

Da die Vermischung der Probe und des Verdünnungsmittels automatisch erfolgt, werden Ermüdung und Langeweile für die Bedienungsperson vermieden. Dies hat eine genauere und gründlichere Durchmischung zur Folge, wodurch wiederum bessere und genauere Ergebnisse erzielt werden. Außerdem kann die Mischung schneller erfolgen, wodurch die Gesamtmeßdauer verkürzt wird. Die in den Figg. 2a bis 2g veranschaulichte Vorgehensweise und Anordnung erfordert keinerlei zusätzliche Vorrichtungen innerhalb oder außerhalb der Behälter, und das einzige in die Behälter ein-tretende Element ist das Mundstück bzw. die Spitze 21, die ohnehin vorhanden sein muß. Die Durchmischung erfolgt durch Strömungsbewegung, wodurch bessere Ergebnisse bei optischer Vermessung der Proben erzielt werden. Die Einführung von Luft bei den bekannten Vorrichtungen, die mit Luftblasendurchgasung zur Vermischung arbeiten, kann optische Beeinträchtigungen zur Folge haben. Auch die

3115568

3

- 10 -

Anwendung von Rührstäben und -stangen wird erübrigt, wodurch die Anordnung weniger kompliziert und in der Herstellung und der Betriebsweise wirtschaftlicher wird.

Die Erfindung wurde vorstehend anhand bevorzugter Ausführungsbeispiele beschrieben, denen jedoch keinerlei einschränkende Bedeutung zukommt und die in mannigfacher Weise abgewandelt werden können, ohne daß hierdurch der Rahmen der Erfindung verlassen wird. Während beispielsweise die Erfindung vorstehend anhand der Vermischung und Verdünnung einer Probensubstanz für nephelometrische Messungen beschrieben wurde, eignet sie sich ebenso zur vorteilhaften Anwendung bei anderen Test- und Versuchsapparaturen. Die Erfindung kann vorteilhaft praktisch bei jeder Test- bzw. Versuchsapparatur Anwendung finden, bei welcher eine Vermischung und Verdünnung einer Probensubstanz erforderlich ist. Während des weiteren die Erfindung in der Anwendung zur Verdünnung einer Probe beschrieben wurde, eignet sie sich mit Vorteil auch zur Anwendung in all den Fällen, wo zwei oder mehrere Flüssigkeiten miteinander vereinigt und innig vermischt werden sollen.

-14-

Leerseite

THIS PAGE BLANK (USPTO)

-15-

Nummer: 3115568
 Int. Cl. 3: B01F 3/08
 Anmeldetag: 16. April 1981
 Offenlegungstag: 15. April 1982

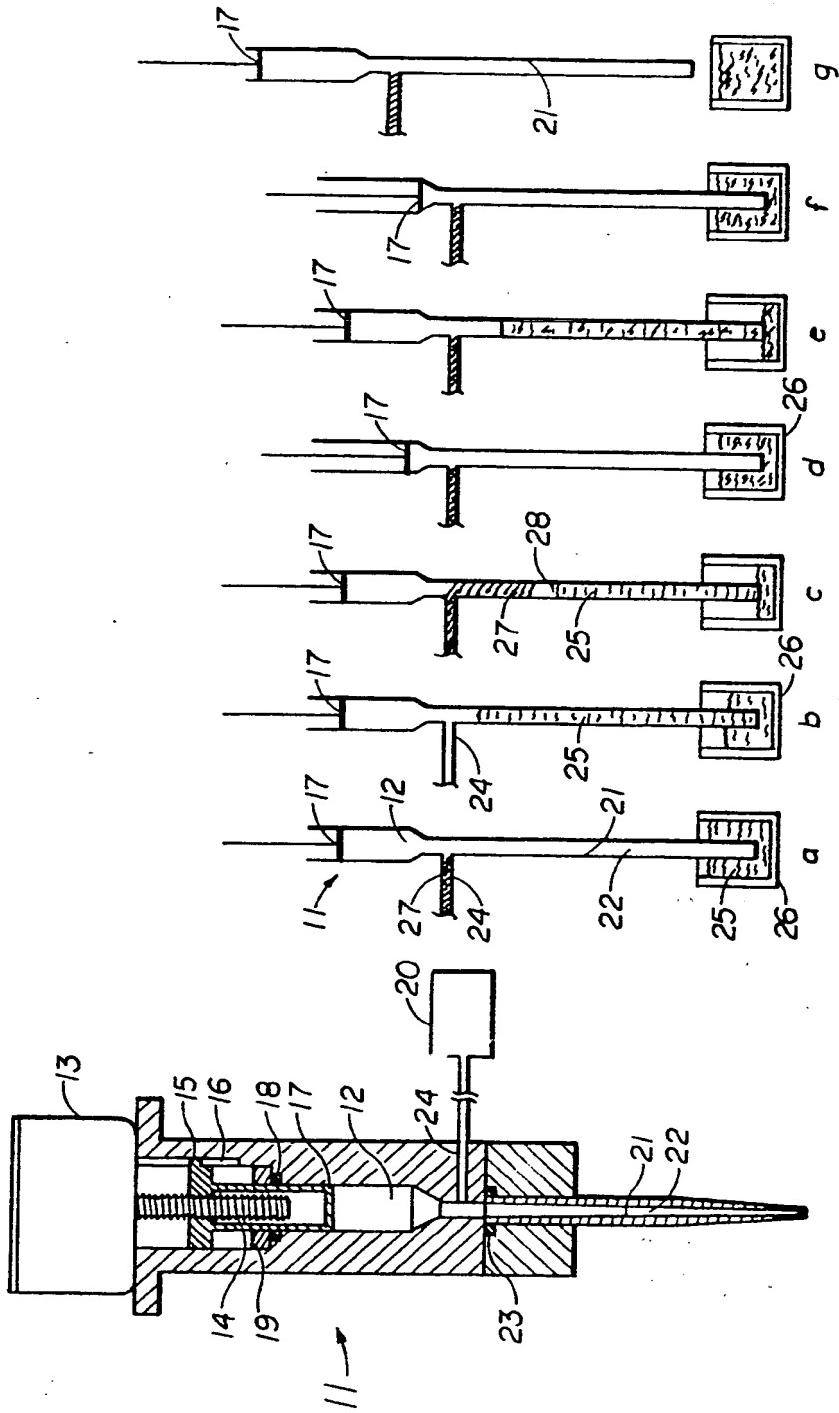


FIG 1

FIG 2

Patentanwälte
 Dipl.-Ing. C. Wallach
 Dipl.-Ing. G. Koch
 Dr. T. Hiltbach
 Dipl.-Ing. R. Feldkamp
 8 München 2
 Max-Joseph-Str. 8, Tel. (089) 240278